

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med., Dr. rer. nat. Ernst Schütte

Untersuchungen über die Wirkung der Isomeren
des Glycerinaldehydes auf die
Phosphatidsynthese und die Membranfunktionen
von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jan Simon

aus Mülheim/Ruhr

1969

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e. V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med., Dr. rer. nat. Ernst Schütte

Untersuchungen über die Wirkung der Isomeren des Glycerinaldehydes auf die Phosphatidsynthese und die Membranfunktionen von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jan Simon

aus Mülheim/Ruhr

Dekan: Professor Dr. med. Hans Heinz Naumann
Referent: Privatdozent Dr. med. Dipl. Chem. Peter Schmialek
Korreferent: Professor Dr. med., Dr. rer. nat. Heinz Tiedemann



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 17. April 1969

Inhaltsverzeichnis

1.0.0. Einleitung.	Seite 3
2.0.0. Material.	" 7
3.0.0. Methoden.	" 9
3.1.0. Anordnung der Versuche zur Bestimmung des Einbaus 32 von P in die Phosphatide.	" 10
3.2.0. Isolierung der Phosphatide und Messung der einge- bauten Radioaktivität.	" 11
3.3.0. Identifizierung der 32 P-markierten Phosphatide.	" 13
3.4.0. Bestimmung des Rohrzuckerverteilungsraumes von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.	" 16
3.5.1. Bestimmung der Wachstumskurven von Ehrlich-As- cites-Tumorzellen nach Inkubation mit D- und L- Glycerinaldehyd.	" 17
3.5.2. Bestimmung der Wachstumskurven von embryonalen Zellen.	" 18
3.5.3. Bestimmung der Wachstumskurven von permanenten, embryonalen Zellen.	" 19
3.6.0. Fixierung und Einbettung von Ehrlich-Ascites- Tumorzellen zur elektronenmikroskopischen Unter- suchung.	" 20
4.0.0. Ergebnisse zur Hemmung des 32 P-Einbaus in die Ge- samtfraktion der Phosphatide.	" 21
4.1.0. Ergebnisse zur Phosphateinbauhemmung in die Phos- phatide Lecithin und Kephalin.	" 22

4.2.o. Verteilung der Radioaktivität auf die Fraktionen der Aufarbeitung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.	Seite 23
4.3.o. Permeabilitätsveränderungen der Zellmembran von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen nach Inkubation mit D- und L-Glycerinaldehyd.	" 24
4.4.o. Wachstumskurven.	" 26
4.5.o. Verdopplungszeiten.	" 31
4.6.o. Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Unter- suchungen der Zellmembran.	" 32
5.o.o. Diskussion.	" 33
6.o.o. Zusammenfassung.	" 43
7.o.o. Literaturverzeichnis.	" 44

Inhaltsverzeichnis

1.o.o. Einleitung.	Seite 3
2.o.o. Material.	" 7
3.o.o. Methoden.	" 9
3.1.o. Anordnung der Versuche zur Bestimmung des Einbaus 32 von P in die Phosphatide.	" 10
3.2.o. Isolierung der Phosphatide und Messung der einge- bauten Radioaktivität. 32	" 11
3.3.o. Identifizierung der P -markierten Phosphatide.	" 13
3.4.o. Bestimmung des Rohrzuckerverteilungsraumes von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.	" 16
3.5.1. Bestimmung der Wachstumskurven von Ehrlich-As- cites-Tumorzellen nach Inkubation mit D- und L- Glycerinaldehyd.	" 17
3.5.2. Bestimmung der Wachstumskurven von embryonalen Zellen.	" 18
3.5.3. Bestimmung der Wachstumskurven von permanenten, embryonalen Zellen.	" 19
3.6.o. Fixierung und Einbettung von Ehrlich-Ascites- Tumorzellen zur elektronenmikroskopischen Unter- suchung.	" 20
4.o.o. Ergebnisse zur Hemmung des P -Einbaus in die Ge- 32 samtfraktion der Phosphatide.	" 21
4.1.o. Ergebnisse zur Phosphateinbauhemmung in die Phos- phatide Lecithin und Kephalin.	" 22

4.2.o. Verteilung der Radioaktivität auf die Fraktionen	Seite 23
der Aufarbeitung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.	
4.3.o. Permeabilitätsveränderungen der Zellmembran von	
Ehrlich-Ascites-Tumorzellen nach Inkubation mit	
D- und L-Glycerinaldehyd.	" 24
4.4.o. Wachstumskurven.	" 26
4.5.o. Verdopplungszeiten.	" 31
4.6.o. Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Unter-	
suchungen der Zellmembran.	" 32
5.o.o. Diskussion.	" 33
6.o.o. Zusammenfassung.	" 43
7.o.o. Literaturverzeichnis.	" 44

1.o.o. Einleitung

Im Jahre 1929 berichtete B. Mendel (1), daß der D, L-Glycerinaldehyd (GA)
-3
in einer Konzentration von 10^{-3} M/l die Gärung von Schnitten des Jensen-Sarkoms fast vollständig hemmt. Drei Jahre später fanden Mendel, Strelitz
-3
und Mundell (2), daß das Racemat in einer Konzentration von 10^{-3} M/l die anaerobe Glykolyse desselben Untersuchungsobjektes um 74 % verringert. Die Inhibition durch das D-Isomere betrug nur 11 % verglichen mit der Glykolyse der Kontrolle.

Obwohl sich schon bei den früheren Experimenten zeigte, daß die Isomeren des GA unterschiedlich starke Wirkungen auf die anaerobe und aerobe Glykolyse haben, wurden weitere Untersuchungen über den Einfluß des GA auf den Kohlehydratstoffwechsel allein mit dem Racemat unternommen (3, 4, 5, 6).

Als die Glykolysehemmung durch den GA in den verschiedenen Geweben gemessen wurde, fand man einerseits eine Inhibition in Hirn-, Tumor- und embryonalem Gewebe, andererseits keine Hemmung der Milchsäurebildung aus Glukose oder Stärke im Muskelhomogenat (4). So erschien anfangs die Möglichkeit einer Differenzierung der Gewebe in solche, deren Glykolyse hemmbar und andere, deren Glykolyse durch GA nicht hemmbar ist, wissenschaftlich interessanter, als die Untersuchung der Wirkunterschiede der Beiden Isomeren des GA.

Meyerhoff et al. konnten (7) 1936 zeigen, daß das Ferment Aldolase den D-GA mit Dioxycetonphosphat zu Fruktose-1-Phosphat kondensiert, während in der analogen Reaktion aus dem L-Isomeren Sorbose-1-Phosphat entsteht. Als Lardy et al. beobachteten (8), daß das Sorbose-1-Phosphat die Hexokinase kompetitiv hemmt, war für die von Mendel (1) gefundene, unterschiedlich starke Glykolyseinhibition der GA-Isomeren eine Erklärungsmöglichkeit gegeben.

Durch die 1964 von Warburg und Mitarbeitern publizierten überraschenden Ergebnisse der Heilung des Ehrlich-Ascites (EA)-Krebses durch D- und L-Aldehyd (9), geriet der GA erneut in den Blickpunkt wissenschaftlichen und klinisch-therapeutischen Interesses. Die Untersucher berichteten, daß beide Isomere das Angehen des Ascites verhindern, wenn sie in einer Menge von 150-400 μM spätestens 3 Tage nach Inokulation der EA-Zellen i. p. injiziert werden. Nach den Angaben dieser Arbeitsgruppe schien der D-GA in diesen Experimenten sogar wirksamer zu sein als das L-Isomere. Weiterhin wurden durch Warburg und Mitarbeiter die Untersuchungen anderer Autoren über das Ausmaß der Glykolysehemmung durch den L-Aldehyd unter anaeroben und aeroben Versuchsbedingungen, die nur schwache Inhibition durch das D-Isomere, und die Nichtbeeinflussung der Atmung durch beide Isomere bestätigt.

Durch diese Ergebnisse Warburgs und seiner Mitarbeiter wurden eine Vielzahl von Untersuchungen induziert, in denen der Wirkmechanismus des physiologischen D-GA erklärt und gegen die Wirkungsweise des L-Aldehyds, die man, beeinflusst durch die Ergebnisse von Lardy et al., in einer Hemmung der Hexokinase begründet sah, abgegrenzt werden sollte.

Neben diesen biochemischen Aspekten wurde aber auch die Möglichkeit einer klinischen Nutzung des GA als Krebstherapeutikum durch verschiedene Arbeitsgruppen diskutiert und in weiteren in-vivo- und in-vitro Experimenten untersucht.

In zwei fast gleichzeitig erschienen Arbeiten von Drews et al. (10) und einer italienischen Arbeitsgruppe (11) wurde über die Wirkung des GA auf die Proteinsynthese berichtet. Die Ergebnisse beider Arbeiten stimmen nur teilweise überein. Während Drews und Mitarbeiter fanden, daß das Racemat und der D-GA sowohl unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen am stärksten

inhibieren, berichteten Guidotti et al. über eine fast totale Hemmung durch das L-Isomere bei gleichen GA-Konzentrationen (0,01 M/l). Möglicherweise sind diese unterschiedlichen Ergebnisse entweder durch die Verwendung verschiedener Untersuchungsobjekte oder durch ein unbegründetes Vertrauen in die Reinheit der im Handel befindlichen Präparate zu erklären (siehe auch 2.o.o. Material). Eine Arbeitsgruppe aus der DDR (12), die das Racemat als Inhibitor verwendete und wie Drews mit EA-Zellen arbeitete, konnte jedoch die an Yoshida-Asciteszellen gewonnenen Ergebnisse Guidottis bestätigen.

Oelkers et al. (13) untersuchten die Wirkung der GA-Isomeren auf die Biosynthese der RNS und der DNS. Untersuchungsobjekt waren EA-Zellen. Sie beobachteten, daß der L-GA unter anaeroben Bedingungen den Thymidin- bzw. Uridin-Einbau in die DNS bzw. RNS fast vollständig hemmt, während die Wirkung unter aeroben Bedingungen nur gering ist. Das D-Isomere verringert den Einbau in die RNS bei O₂-Zufuhr und anaerob um ca 20 %, während die Thymidineinbauhemmung unter beiden Versuchsbedingungen rund 90 % beträgt. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Resultaten überein, die Langen, Bielka und J. Stahl erzielten (12).

Wenn man von der Arbeitshypothese ausgeht, daß der cytotoxische Effekt des GA durch eine Hemmung der Zellvermehrung bedingt wird, so kommt als mögliche Ursache dieser Erscheinung neben der Inhibition der Protein- und Nukleinsäuresynthese eine Beeinflussung des Membranaufbaus in Frage. Da die Phosphatide einerseits maßgeblichen Anteil an der Struktur der Membranen haben, andererseits die Entwicklung der Zellmembranen für die Zellteilung möglicherweise mitverantwortlich ist (14), schien es von Interesse, den Einfluß der GA-Isomeren auf die Phosphatidsynthese zu prüfen. Gleichzeitig wäre die Membran auf morphologische und funktionelle Veränderungen, die durch die Phosphatidsynthesehemmung bedingt sein könnten, zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wird der P-Einbau in Lecithin und Kephalin und in die Gesamtfraktion der Phosphatide unter Beeinflussung der Isomeren des GA gemessen. Um mögliche Membranveränderungen zu erkennen, wurden die durch die Isomeren des GA geschädigten Zellen elektronenmikroskopisch untersucht und ihr Permeabilitätsverhalten geprüft.

In weiteren Experimenten wird der cytotoxische Effekt der GA-Isomeren auf normale und maligne Zellen untersucht. Diese Versuche sollen einmal eine experimentelle Lücke schliessen, indem sie die cytotoxische Wirkung der Isomeren quantifizieren, zum anderen soll durch diese Untersuchungen geprüft werden, ob eine Korrelation besteht zwischen zellabtötender Wirkung und Phosphatidsynthesehemmung und zwischen der Cytotoxizität und der Stoffwechselsituation einer normalen und einer neoplastischen Zelle.

2.0.0. Material

Untersuchungsobjekt waren Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (EA), die in NMRI-Inzuchtmäusen gezüchtet wurden. Der Ascites wurde 7-10 Tage nach Impfung entnommen.

32

Das eingesetzte P wurde als trägerfreies Orthophosphat in verdünnter
+) HCl bezogen.

Der Glycerinaldehyd wurde in Anlehnung an Brice und Perlin (15) selbst synthetisiert, da im Handel erhältliche Präparate - wie auch Oelkers feststellen mußte (13) - den Glycerinaldehyd nur in Spuren enthielten.

Zur Darstellung des D-Isomeren wurde von Fruktose ausgegangen.

++)

5 g D (+) - Fruktose wurden bei Zimmertemperatur in 10 ccm Wasser gelöst, mit 400 ccm Eisessig versetzt und 26,1 g Bleitetraacetat (0,05 g Mol) in 100 ccm Eisessig aufgeschwämmt, unter Rühren eingetragen. Es wurde bis zur Auflösung des Tetraacetats weiter gerührt. Die Bleiionen wurden mit 50 ccm einer 10 %igen Oxalsäurelösung in Eisessig unter Rühren gefällt, abgesaugt und das klare Filtrat im Rotationsverdampfer bei 40 °C eingeengt.

Der zurückbleibende Sirup wurde 5 mal mit dem dreifachen Volumen Essigsäure-äthylester bei etwa 60 °C extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet, vom Trockenmittel abfiltriert und der Rückstand eingeengt. Der Rückstand soll den Glycerinaldehyd-Formiat-Glykolat-Diester enthalten. Dieses Rohprodukt wurde ohne weitere Isolierung 8 Std. bei 50 °C unter ständigem Rühren mit 75 ccm 0,05 n Schwefelsäure hydrolysiert. Nach

+) Radiochemical Centre Amersham, Buckinghamshire, England

++) E. Merck AG, Darmstadt

Abkühlen wurde die klare Lösung über eine Säule von Permutit ESB 26 (regeneriert mit 1 n NaHCO_3) geschickt und damit die Säuren entfernt. Das klare Eluat wurde am Rotationsverdampfer bei 40 °C Badtemperatur im Wasser-



strahlvacuum eingeengt. Der GA im sirupösen Rückstand wurde durch Drehung und Titration (16) bestimmt. Die Reinheit des Präparates wurde chromatographisch auf Cellulose-Dünnschichtplatten nachgeprüft (Abb. 1).

Laufmittel: n-Butanol:Pyridin:Wasser

(60:45:30)

Anfärbung: 1 AgNO_3 in Aceton gesättigt

2 KOH (2 %) in Methanol

3 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (5 %) in Wasser (17)

Die Ausbeute betrug 51 % der Theorie. Der GA wurde mit Wasser auf eine 10 %ige Lösung eingestellt.

Abb. 1: Chromatographie des GA. DI=D-GA, S=Sorbose, LI=L-GA.

Die Ausgangssubstanz für die Synthese des L-Isomeren war L (-) - Sorbose⁺⁾ . Das Vor-

gehen bei Präparation, Gehaltsbestimmung und Nachweis ist wie oben beschrieben. Die Ausbeute betrug 63 % der Theorie.

⁺⁾ E. Merck AG, Darmstadt

3.o.o. Methoden

Zur Gewinnung des Ascites wurde den Mäusen nach Dekapitation das Fell über dem Abdomen abpräpariert und der Ascites durch Punktion aus der Bauchhöhle entnommen. Die Zellen wurden in Zentrifugengläser überführt und dreimal in phosphatfreier Ringerlösung gewaschen. Durch 5 Minuten langes zentrifugieren bei 200 g wurden die Zellen vorsichtig sedimentiert.

Zusammensetzung der Ringerlösung (18):

- | | | |
|----|-----------|--|
| 1. | 100 Teile | einer 0,90 %igen NaCl-Lösung |
| 2. | 4 " | " 1,15 " KCl- " |
| 3. | 3 " | " 1,22 " CaCl_2 " |
| 4. | 1 Teil | " 3,82 " $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -Lösung |
| 5. | 21 Teile | " 1,30 " NaHCO_3 -Lösung |

Die Stammlösungen wurden bei -2°C in der Kühlkammer aufbewahrt. Zu jedem Versuch wurde der Krebs-Bicarbonat-Ringer neu hergestellt. Nach dem Zusammengeben der Salzlösungen wurde mit CO_2 10 Minuten begast.

Mit Hilfe der Cytocritmethode wurde eine 10 %ige Zellsuspension hergestellt.

Zur Kontrolle wurde eine Trockengewichtsbestimmung durchgeführt.

Das radioaktive Orthophosphat in 0,1 n HCl wurde mit 1,6 mg KH_2PO_4 gelöst in 0,2 ml Wasser, versetzt. Anschließend wurde mit 1 n KOH neutralisiert und, nachdem 1,5 ml Bicarbonat-Ringer dazugegeben worden war, mit CO_2 begast. Der pH wurde mit Indikatorpapier geprüft.

Ich benutzte für die Inkubation kastenförmige Warburg-Gefäße mit einem Seitenarm. Sie wurden vor jedem Versuch mindestens zwei Tage in Nitriergemisch von anhaftendem organischem Material befreit. Anschließend wurden sie mit einer Pril-Lösung gewaschen. Die Rückstände wurden durch Spülen in

Leitungswasser, Austauscher- und bidestilliertem Wasser entfernt.

32

3.1.o. Anordnung der Versuche zur Bestimmung des Einbaus von ³²P in die

Phosphatide.

Die Inkubationsgefäße wurden nach folgendem Schema beschickt:

Gefäß Nr.	³² P als Phosphat	GA in Wasser	Glucose in Ringerlsg.	10 %ige Zellsusp.	Ringer- lösung
1	0,056 mC in 0,15 ccm	10 mg D-GA in 0,1 ccm	20 mg in 0,2 ccm	2,0 ccm	0
2	"	"	"	"	0
3	"	10 mg L-GA in 0,1 ccm	"	"	0
4	"	"	"	"	0
5	"	0	"	"	0,1 ccm
6	"	0	"	"	"

Gesamtvolumen jedes Ansatzes: 2,45 ccm.

-2

Konzentration des GA: 4×10^{-2} M/l.

-2

Phosphatkonzentration: $5,87 \times 10^{-2}$ M/l.

Die Gefäße wurden unmittelbar nachdem die Zellen einpipettiert worden
waren eingehängt. Nach einer 15minütigen Begasung wurde der Inhalt der
Seitenarme (³²P) durch Schwenken in den Hauptraum überführt .⁺

Inkubationsdauer: 45 min Temperatur : 37,5 °C

Schüttelfrequenz: 90 U/min Schüttelamplitude: 2,5 cm

Gasphase: aerob 20 % O₂ - 5 % CO₂ - 75 % N₂, anaerob 5 % CO₂ - 95 % N₂

Unmittelbar nach Abschluß der Inkubation wurden die Warburggefäße in ein

⁺) Warburgapparat F 26 der Firma Braun Apparatebau, Melsungen.

Eisbad gestellt und die Asciteszellen dreimal mit 1 ccm eiskalter Ringerlösung in Zentrifugengläser gespült. Nach Zentrifugation bei 200 g und anschließender Entfernung des Überstandes wurde zweimal mit kaltem Ringer gewaschen.

3.2.0. Isolierung der Phosphatide und Messung der eingebauten Radioaktivität.

Die Gewinnung der Phosphatide erfolgte in Anlehnung an Folch et al. (19). Die gewaschenen Zellen wurden mit ca 2 ccm Oberphase nach Folch in Potter-Elvehjem-Homogenisatoren überführt und 2 min scharf homogenisiert. Die Abtrennung der Lipide und Lipoide erfolgte in 100 ccm Scheidetrichtern, in denen sich 80 ccm Folchgemisch befanden. Nach 30 min hatten sich die Phasen klar getrennt. Ein "interfacial fluff" war meist nicht oder nur schwach ausgeprägt.

Die untere Phase wurde abgelassen und in 100 ccm - NS 14 - Kolben aufgefangen. Die Unterphase enthielt die Phosphatide. (Die beiden Phasen des Folchgemisches wurden getrennt hergestellt und bei -20° C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt). Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer entfernt. Von dem erhaltenen Extrakt wurde nach erneutem Lösen in 3 ccm Unterphase je 1/3 auf Probenschälchen gegeben und mit einem Endfensterzählrohr im Probenwechsler gemessen⁺⁾ . Ein weiteres Drittel wurde auf Kieselgel-Dünnschichtplatten aufgetragen, um das Phosphatidgemisch in seine Komponenten aufzutrennen. Als Referenzsubstanzen dienten Lecithin und Kephalin. Als Laufmittel wurde ein Chloroform-Methanol-Wasser-Gemisch in dem Verhält-

+) Endfensterzählrohr FHZ 15c, autom. Probenwechsler FH 448, Registriergerät FH 49A der Firma Friesseke-Höpfner, Erlangen-Bruck.

nis 65:30:6 verwandt. Die Banden wurden durch J_2 -Dampf angefärbt. Zur Identifizierung wurden zusätzlich nachfolgende Anfärbemittel benutzt (20):

1. Ninhydrin (Aminophosphatide)
2. Ammoniummolybdat-Perchlorsäure (Phosphors.)
3. Dragendorffreagenz mod. nach Munier und Macheboeuf (Cholinphosphatide)
4. Bialreagenz (Cerebroside, Ganglioside)

Die Chromatogramme wurden anschließend autoradiographiert. Als Film wurde ein Curix-X-Ray-Film (Agfa) benutzt. Die Expositionszeit betrug 12 - 14 h. Die Filme befanden sich 5 min bei Raumtemperatur im Entwicklerbad (Kodak D-19b) und 10 min im Fixierbad (Kodak Unifix).

Einige Autoradiographien wurden densitometrisch ausgewertet. Zu diesem Zweck wurden die exponierten, entwickelten und fixierten Röntgenfilme in Streifen

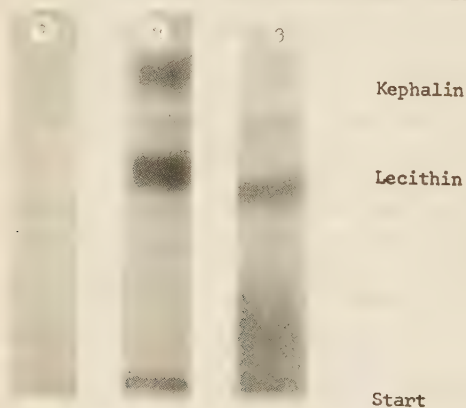


Abb. 2 Autoradiographie. Auswertung eines Versuches unter aeroben Versuchsbedingungen (siehe 3.1.0.).

1 bzw. 3: Beeinflussung des ³²P - Einbaus in die Phosphatide durch das L - bzw. D-Isomere. 2 Kontrolle.

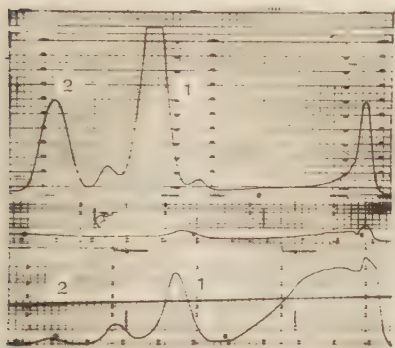
geschnitten und die Schwärzungsintensität der Banden in Abhängigkeit von der Laufstrecke im Spektralphotometer ⁺⁾ aufgezeichnet.

Wellenlänge: 617 nm

Spaltbreite: 0,02 mm

$E_{\max}$: 1

Schreibgeschwindigkeit: 16 cm/min



Kontrolle

Einbauhemmung durch L-GA

Einbauhemmung durch D-GA

Abb. 3: Densitometerkurven zu obiger Autoradiographie (Abb. 2).

1: Lecithin, 2: Kephalin.

32

3.3.o. Identifizierung der ³²P-markierten Phosphatide.

An Hand der Autoradiographien wurden die markierten Banden angezeichnet und sorgfältig mit einem Spatel von den Kieselgel-Dünnschichtplatten abpräpariert. Die Fraktionen wurden in Säulen überführt. Mit einem Chloroform:Methanol:Wasser:Gemisch (65:30:6) wurden die Phosphatide eluiert. Das Eluat wurde im Rotationsverdampfer vollständig eingeeengt, in 2 ccm erneut gelöst und in je zwei Reagenzgläser überführt.

+) PMQ II mit Chromatogrammansatz CAZ der Firma Carl Zeiss, Wetzlar.

Nach erneutem Einengen der Eluatrückstände der einzelnen Banden wurden die
+) Phosphatide enzymatisch mit Phospholipase C hydrolisiert (21).

Ansatz:

1. "Äther-Medium"

- a. 1 ccm Äther-Alkohol (98:2).
- b. 0,02 ccm einer 0,04 molaren CaCl_2 -Lösung.
- c. 0,02 ccm einer 0,15 %igen Phospholipase-Lösung in 0,1 molaren Trispuffer (P_H 7,0).

2. "wässriges Medium"

- a. 0,8 ccm eines 2 mmolaren Trispuffers, der 0,1 molar KCl und 0,5 mmolar CaCl_2 enthält (P_H 7,3).
- b. 0,18 ccm einer wässrigen 0,2 %igen Phospholipase-Lösung.

Die Ansätze wurden in der Schüttelmaschine bei Raumtemperatur 1 h geschüttelt.

Nach der Hydrolyse wurden die Lösungsmittel abgedampft und anschließend 0,5 ccm Wasser und 1,0 ccm Chloroform dazugegeben. Die wässrige

Phase wurde vorsichtig abgenommen und zusammen mit den Referenzsubstanzen auf Cellulose-Dünnschichtplatten aufgetragen. Laufmittel war ein Phenol:Butanol:Essigsäure:Wasser-Gemisch (22). Nach der chromatographischen Trennung wurden die Cellulose-Dünnschichtplatten mit Warmluft getrocknet und die Lage der radioaktiv mar-

Abb. 4: Chromatographische
Trennung der Phosphatide
(siehe 3.2.o.)

Die Ansätze wurden in der Schüttelmaschine bei Raumtemperatur 1 h geschüttelt. Nach der Hydrolyse wurden die Lösungsmittel abgedampft und anschließend 0,5 ccm Wasser und 1,0 ccm Chloroform dazugegeben. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und zusammen mit den Referenzsubstanzen auf Cellulose-Dünnschichtplatten aufgetragen. Laufmittel war ein Phenol:Butanol:Essigsäure:Wasser-Gemisch (22). Nach der chromatographischen Trennung wurden die Cellulose-Dünnschichtplatten mit Warmluft getrocknet und die Lage der radioaktiv mar-

+) Calbiochem Luzern, Schweiz.

kierten Substanzen durch Autoradiographie bestimmt. Es wurde nach folgendem Schema aufgetragen:

Platte 1

C = Phosphorylcholin + Eluat Bande 1

E = Phosphoryläthanolamin + " " 1

S = Phosphorylserin + " " 1

Su = Summe der Referenzen + " " 1

(Die Anordnung und Nummerierung der radioaktiv markierten Banden zeigt die Abbildung 4).

Entsprechend wurde das Eluat der Banden 2 und 3 aufgetragen. Da die Eluate der drei Banden zur Hälfte in Äther-Medium, zur Hälfte in wässrigem Medium hydro-

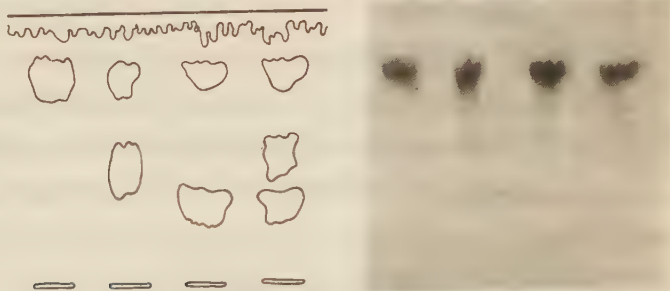


Abb. 5: Chromatogramm des Eluats aus Bande 3 nach Hydrolyse auf eine Glasplatte abgezeichnet - linkes Bild. Rechts die entsprechende Autoradiographie.

lisiert wurden, waren sechs Platten zur Identifizierung nötig. Nachdem die Cellulose-Dünnschichtplatten angefärbt und mit den Autoradiographien zur Deckung gebracht worden waren, konnten die radioaktiv markierten Banden identifiziert werden.

Die Anfärbung erfolgte mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure (20).

Die Referenzsubstanzen Phosphoryläthanolamin und Phosphorylserin wurden selbst⁺⁾ hergestellt (23, 24). Das Phosphorylcholin wurde von Light bezogen.

3.4.0. Bestimmung des Rohrzucker-Verteilungsraumes von Asciteszellen.

Da die Saccharose bei ungeschädigter Membran nicht in die tierische Zelle gelangen kann (25), zeigt eine Vergrößerung des Verteilungsraumes für Rohrzucker eine Permeabilitätsveränderung bzw. eine Schädigung der Zellmembran an (26).

In drei Warburggefäßen wurden angesetzt:

1. 2,0 ccm einer 10 %igen Zellsuspension.
2. 0,05 ccm einer 10 %igen D- bzw. L-GA-Lösung bzw. 0,05 ccm Ringer-Lösung.
3. 0,1 ccm Glucose-Ringer-Lösung (10 % Glucose).

Nach einer 90 minütigen Inkubation unter anaeroben Bedingungen wurden die Zellen in Zentrifugengläser überführt. Es wurde 5 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und die Gläser mit Filterpapier ausgetupft.

Nachdem in jedes der Zentrifugengläser 2 ccm einer 7 %igen Saccharose-Lösung gegeben worden war, wurden die Zellen aufgeschwemmt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert (5 min bei 200 g und anschließend 2 min bei 1700 g). Der Überstand wurde abgossen und die Zentrifugengläser sorgfältig mit Filterpapier getrocknet, um an der Wandung haftende Rohrzuckerlösung zu entfernen.

In dem Zellsediment wurde anschließend die Rohrzuckermenge nach Wahler (27) bestimmt. Bei dieser Bestimmung wird das Disaccharid durch 36 %ige HCl hydro-

+) Koch-Light Laboratories Ltd. Colnbrook, Buckinghamshire, England.

lysiert. Die freigesetzte Fruktose wird nach Überführung in Oxymethylfurfurol an Resorcin gekoppelt.

Die Intensität der entstehenden Färbung wurde photometrisch ⁺⁾ bestimmt. Die Rohrzuckerkonzentration in den einzelnen Proben wurde über eine Eichkurve ermittelt.

3.5.1. Bestimmung der Wachstumskurven von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen nach Inkubation mit D- und L-Glycerinaldehyd.

Einer getöteten Maus wurde mit einer 10 ccm-Recordspritze, in der sich 2 ccm Eagle-Medium (28) befanden, steril ca 8 ccm Ascites entnommen.

In einem Aliquot wurde die Zellzahl bestimmt und durch entsprechende Verdünnung des Ascites eine Zellsuspension hergestellt, die pro ccm Medium 5×10^5 Zellen enthielt. Von dieser Suspension wurden je 2 ccm in Leighton-Röhrchen ⁺⁺⁾ gegeben. Nach dem Einpipettieren wurde mit 5 %igem CO_2 begast.

Die Zellen wuchsen als Monolayer auf schmalen, kleinen Objektträgern ähnlichen, Glasplättchen, die sich in den Kulturröhrchen befanden.

Schema:

	D-GA		L-GA		Kontr.
Molarität der GA-Lösung	0,04	0,004	0,04	0,004	
Gesamtzahl der Kulturen	10	10	10	10	10
tägliche Entnahme	2	2	2	2	2

Die Zellkulturen wurden für 24 h bei 37 C im Brutschrank belassen. Nach die-

+) Spektralphotometer PMQ II der Firma Carl Zeiss, Wetzlar.

++) Bellco Glass Inc. Vineland, New Jersey, USA.

ser Zeit wurden die Röhrchen geöffnet, das Medium vorsichtig abgegossen und anschließend mit Eagle-Medium ohne Zusatz von Kälberserum gespült. Dann wurden die Zellen in Eagle-Medium, dem steril filtrierter GA^{+) in zwei Konzentrationen (Endkonzentrationen siehe Schema) zugesetzt worden war, 45 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde das den GA-enthaltnde Medium abgegossen und die EA-Zellen in Eagle-Medium, das 10 % Serum enthielt, resuspendiert. Hiernach wurde erneut begast (5 % CO₂).}

Im Anschluß an diese Manipulationen wurden pro Isomeres und pro GA-Konzentration zwei Kulturröhrchen geöffnet und die Glasplättchen entnommen. Nach Anfärbung (Pappenheim) wurden für jeden der Ansätze 10 Felder bei 200facher Vergrößerung über einem Raster ausgezählt.

3.5.2. Bestimmung der Wachstumskurven von embryonalen Zellen nach Inkubation mit D- und L-Glycerinaldehyd.

Embryonale Zellen wurden nach folgender Methode gewonnen:

Eine tragende Maus wurde dekapitiert und die Embryonen steril entnommen. Nachdem sie getötet worden waren, wurden sie in einer 0,25 %igen Trypsinlösung zerkleinert. Die embryonalen Gewebsteile wurden dann 30 min bei Raumtemperatur gerührt, größere Gewebestücke über Mull steril abfiltriert und anschließend die erhaltene Zellsuspension 30 min bei 500 U/min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellmaterial in Eagle-Medium, dem 10 % Kälberserum zugesetzt worden war, suspendiert.

Nach Bestimmung der Zellkonzentration durch Auszählen in der Zählkammer wurde

+) Millipore-Filter Typ TH, Porengröße 0,24 μ m $\pm$ 0,02 μ m.

Millipore-Filter GmbH, Neu-Isenburg.

die Suspension auf 5×10^5 Zellen/ccm Medium eingestellt und anschließend je 2 ccm in Leighton-Röhrchen ausgesät.

Die Versuchsanordnung entsprach modifiziert der des 1. Versuches zu Bestimmung der Wachstumskurven.

Schema:

	D-GA			L-GA			Kontr.
Molarität der GA-Lösung	0,04	0,004	0,0004	0,04	0,004	0,0004	
Gesamtzahl der Röhrchen	10	10	10	10	10	10	10
tägliche Entnahme	2	2	2	2	2	2	2

3.5.3. Bestimmung der Wachstumskurven von permanenten, embryonalen Mäusezellen nach Inkubation mit D- und L-Glycerinaldehyd.

Da sich die EA-Tumorzellen leicht vom Glas ablösen, ergaben sich, bedingt durch die Manipulation bei der Inkubation mit GA, sehr unterschiedliche Ausgangszellkonzentrationen. Um dies auszuschließen, wurde ein dritter Versuch mit maligne gewordenen, embryonalen Zellen von NMRI-Inzuchtmäusen^{+) durchgeführt. Diese Zellen verbinden die Eigenschaft der normalen, embryonalen Zellen, schnell anzuwachsen und fest zu haften, mit der der Malignität. Sie rufen nach intra-peritonealer Injektion bei der Maus einen Ascites hervor und sind vom morphologischen Aspekt den EA-Zellen sehr ähnlich.}

Anordnung und Auswertung dieses Versuches entsprach der des vorstehenden Ex-

+) Dieser Zellstamm wurde aus normalen embryonalen Zellen durch längere Kultivierung in vitro erhalten.

perimentes. Deshalb wurde auf die Angabe eines Schemas verzichtet.

3.6.o. Fixierung und Einbettung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen zur elektronenmikroskopischen Untersuchung.

Die Zellen wurden dreimal in Ringerlösung gewaschen und anschließend in Glutaraldehydlösung (5 %) oder in OsO_4 -Lösung (1 %) resuspendiert und fixiert. Nach einer Stunde wurde das Fixationsmittel entfernt und mit Phosphatpuffer dreimal gewaschen. Die Entwässerung erfolgte in der Acetonreihe. Als Einbettungs⁺⁾ material wurde Mikropal verwandt.

Die Einbettung der Präparate und das Schneiden der Gelatine kapseln erfolgte im Zoologischen Institut der Freien Universität Berlin.

+) Ferak, Friedrichsbrunnerstr. 3-5, Berlin 47.

4.0.0. Ergebnisse zur Hemmung des P-Einbaus in die Gesamtfraktion der Phosphatide.

32

Die Versuche zur Messung der P-Einbauhemmung ergaben, daß der L-GA sowohl unter anaeroben wie unter aeroben Versuchsbedingungen stärker inhibiert als das D-Isomere.

32

Die Hemmung des P-Einbaus unter O_2 -Zufuhr betrug für den D-Aldehyd 6,4 % $\pm$ 2,9 % der Kontrolle, für den L-GA wurde eine Hemmung von 82,2 % $\pm$ 4,5 % gemessen.

Unter anaeroben Versuchsbedingungen betrug die gemessene Einbauhemmung für den D-GA 21,0 % $\pm$ 3,6 % und für das L-Isomere 66,6 % $\pm$ 4,4 % der Kontrollen.

aerob.	Einbauhemmung in % der Kontrolle	
Vers.	D-GA	L-GA
1	61,0	15,0
2	80,0	0,0
3	84,0	16,0
4	90,8	3,2
5	90,6	4,0
6	87,0	0,0

anaer.	Einbauhemmung in % der Kontrolle	
Vers.	D-GA	L-GA
1	68,0	23,1
2	67,0	12,0
3	49,0	30,0
4	69,0	13,0
5	64,0	26,0
6	83,2	-

32

Tab. 1 und 2: Einzelergebnisse der P-Einbauversuche in die Phosphatide zur Untersuchung der inhibierenden Wirkung beider GA-Isomeren in An- und Abwesenheit von Sauerstoff. (experimentelle Einzelheiten siehe 3.2.0.).

Die Angabe der Einbauhemmung in % ergibt sich aus der Differenz zwischen der

gemessenen Aktivität der Kontrollen, die gleich 100 % gesetzt wurde, und dem sich daraus errechnenden Wert der jeweiligen Probe. Alle Einzelwerte errechneten sich aus Doppelbestimmungen, die selten um mehr als 10 % differierten.

4.1.0. Ergebnisse zur Phosphateinbauhemmung in die Phosphatide Lecithin und Kephalin.

32

Die Autoradiographien von zwei aeroben und zwei anaeroben ³²P-Einbauversuchen wurden densitometrisch ausgewertet. Es zeigte sich, daß in Anwesenheit von O₂ beide Isomeren den Einbau radioaktiven Orthophosphats in das Kephalin vollständig unterdrücken, während sich für das Lecithin deutliche Unterschiede in der Einbauhemmung durch die beiden Isomeren zeigen. Hier hemmt das L-Isomere fast vollständig, während die entsprechende Wirkung des D-GA nur gering ist (siehe Abbildung 2 und 3).

Unter O₂-Ausschluß zeigten beide Isomere, wie unter aeroben Versuchsbedingungen, eine völlige Hemmung des ³²P-Einbaus in das Kephalin. Während die den ³²P-Einbau inhibierende Wirkung des D-Isomeren in Bezug auf das Lecithin erheblich zunahm, war die entsprechende Wirkung des L-GA unter anaeroben Verhältnissen geringer als in Anwesenheit von Sauerstoff.

Um diese nur qualitativen Aussagen zu quantifizieren, wurden zwei Wege beschritten, die aber beide nicht zum erhofften Ziel führten. So wurde versucht, die einzelnen Banden nach chromatographischer Trennung abzupräparieren, um dann die Einzelaktivitäten bestimmen zu können. Als diese Methode sich als nicht sicher erwies, da chromatographisches Bild und Autoradiographie nicht vollständig zur Deckung gebracht werden konnten, wurde versucht, über die Autoradiographie mit anschließender Densitometrie und planimetrischer Auswertung eine quantitative Aussage zu erhalten. Diese Methode scheint geeignet zur Gewinn-

nung genauer Ergebnisse. Da ich dieses Verfahren jedoch noch nicht sicher beherrschte und einige photochemische Parameter von mir nicht berücksichtigt wurden, schien es mir richtig auf diese Werte zu verzichten.

4.2.o. Verteilung der ³²P-Radioaktivität auf die Fraktionen der Aufarbeitung.

Um festzustellen, inwieweit die ³²P-Einbauhemmung über eine Beeinflussung der Penetration des aktiven Phosphors in die Zelle vorgetäuscht wird, habe ich die Gesamtaktivität der einzelnen Ansätze von 2 aeroben und 2 anaeroben Versuchen und ihre Verteilung bestimmt.

Gemessen wurde:

1. Aktivität des Waschwassers = extrazelluläres und aus der Zelle ausgewaschbares ³²P.

2. Aktivität der oberen Phase = intrazelluläres, nicht auswaschbares ³²P.
nach Folch-Extraktion

3. Aktivität der unteren Phase = intrazelluläres, nicht auswaschbares ³²P.
nach Folch-Extraktion

Die gemessenen Einzelwerte wurden auf die eingesetzte Gesamtaktivität bezogen.

	D-GA	L-GA	Kontr.
Anteil der intrazellulären Aktivität in % der Gesamtaktivität	0,90	0,41	0,72
Anteil der Aktivität der unteren Phase in % der Gesamtaktivität	0,6 $\times 10^{-2}$	0,2 $\times 10^{-2}$	0,6 $\times 10^{-2}$
Anteil der Aktivität der unteren Phase in % der gesamten intrazell. Aktivität	0,70	0,48	0,83

Tab. 3: Verteilung der ³²P-Aktivität unter aeroben Versuchsbedingungen (experimentelle Einzelheiten siehe 3.2.o.).

	D-GA	L-GA	Kontr.
Anteil der intrazellulären Aktivität in % der Gesamtaktivität	0,15	0,076	0,25
Anteil der Aktivität der unteren Phase in % der Gesamtaktivität	0,27 $\times 10^{-2}$	0,14 $\times 10^{-2}$	0,36 $\times 10^{-2}$
Anteil der Aktivität der unteren Phase in % der gesamten intrazell. Aktivität	1,04	0,97	0,71

32

Tab. 4: Verteilung der P-Aktivität unter anaeroben Versuchsbedingungen
(experimentelle Einzelheiten siehe 3.2.o.).

4.3.o. Permeabilitätsveränderung der Zellmembran von EA-Tumorzellen nach
Inkubation mit D- und L-Glycerinaldehyd.

Die Saccharosekonzentration wurde im Zellsediment bestimmt (siehe 3.4.o.).

	Saccharose in mg/ 100 mm ³ Zellsediment		
Vers.	D-GA	L-GA	Kontr.
1	4,080	4,812	1,944
2	2,604	5,208	1,116
3	3,348	4,118	2,064
4	4	5,280	1,560
5	4,080	5,292	1,188

Tab. 5: Einzelwerte zur Bestimmung der Rohrzuckermenge im Zellsediment (ex-
perimentelle Einzelheiten siehe 3.4.o.).

Alle Werte errechneten sich aus Doppelbestimmungen. Die Streuung der Einzelwerte wurde wahrscheinlich weitgehend durch den Umstand bestimmt, daß die Saccharose im Überstand nicht quantitativ vom Sediment getrennt werden konnte.

	Mittelwert	Standardabweichung
D-GA	3,68	$\pm 0,705$
L-GA	4,94	$\pm 0,500$
Kontr.	1,57	$\pm 0,467$

Tab. 6: Mittelwerte und Standartabweichungen zu Tab. 5.

Die Bestimmung des Rohrzuckerverteilungsraumes geschah unter der Annahme, daß die Kontrollwerte die Größe des extrazellulären Raumes angeben. Meine Messungen ergaben einen extrazellulären Raum von 0,02 ccm. Das entspricht einem Anteil von 20 % am Gesamtvolumen des Sedimentes. Dieser Wert steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Untersucher (29, 30).

	D-GA	L-GA	Kontr.
Größe des Saccharoseverteilungsraumes in l und Standardabweichung	$47 \pm 9,1$	$64 \pm 6,4$	$20 \pm 6,0$
Vielfaches der Kontrolle	2,35	3,20	-

Tab. 7: Größe des Saccharoseverteilungsraumes.

Unter dem Einfluß des D-GA vergrößerte sich der Verteilungsraum für die Saccharose auf 0,047 ccm. Dieser Wert entspricht einer Zunahme des Verteilungs-

Zellen/Zählfeld

400

300

200

100

Wachstumskurven von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen unter Beeinflussung von D- und L-Glycerinaldehyd.

- 1- Kontrolle
- 2- D-GA 0,004 molar
- 3- L-GA 0,004 "
- 4- D-GA 0,04 "
- 5- L-GA 0,04 "

1.Tag

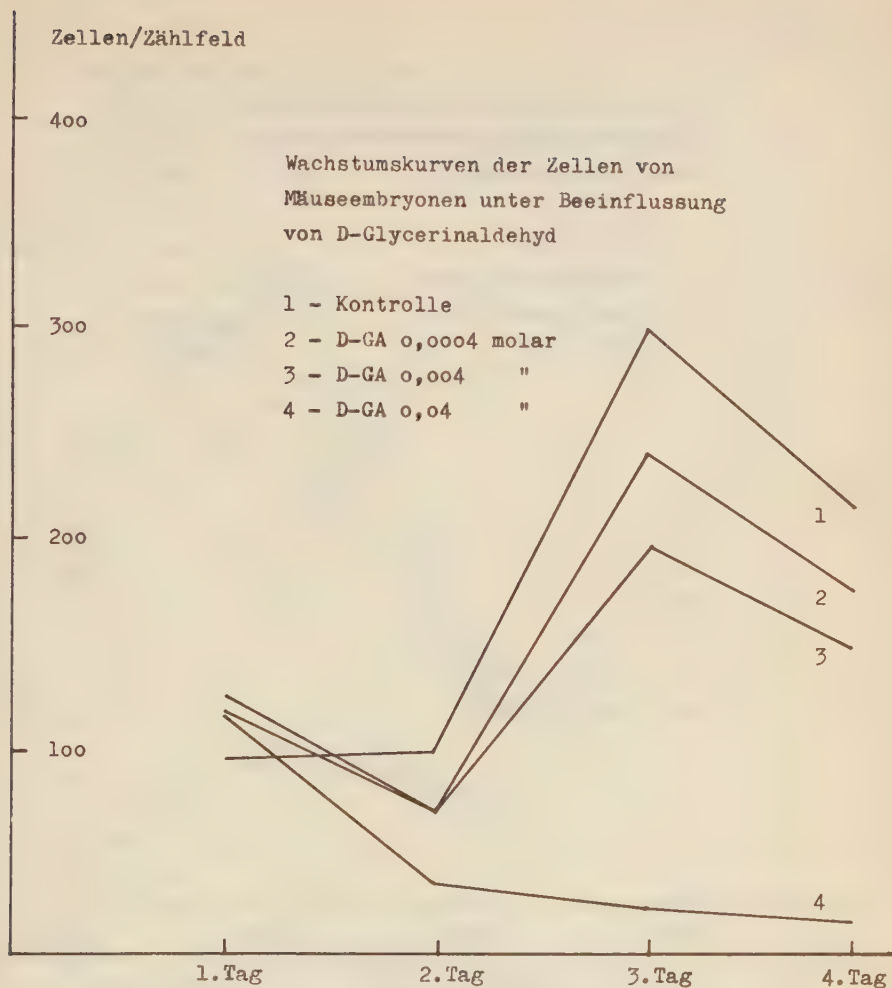
2.Tag

3.Tag

4.Tag

	Kontrolle	D-GA		L-GA	
		0,004M/l	0,04M/l	0,004M/l	0,04M/l
1.Tag	50,2 13,40	6,6 0,86	6,4 0,69	20,1 2,41	13,0 0,44
2.Tag	54,5 8,90	20,4 2,25	6,9 0,09	37,0 6,53	11,4 1,45
3.Tag	172,0 18,12	31,0 1,17	13,5 1,73	56,6 5,47	11,6 1,87
4.Tag	367,3 27,7	195,0 16,08	75,9 12,38	122,0 18,21	4,7 0,05

Werte zu den Kurven (Zellen/Zählfeld).



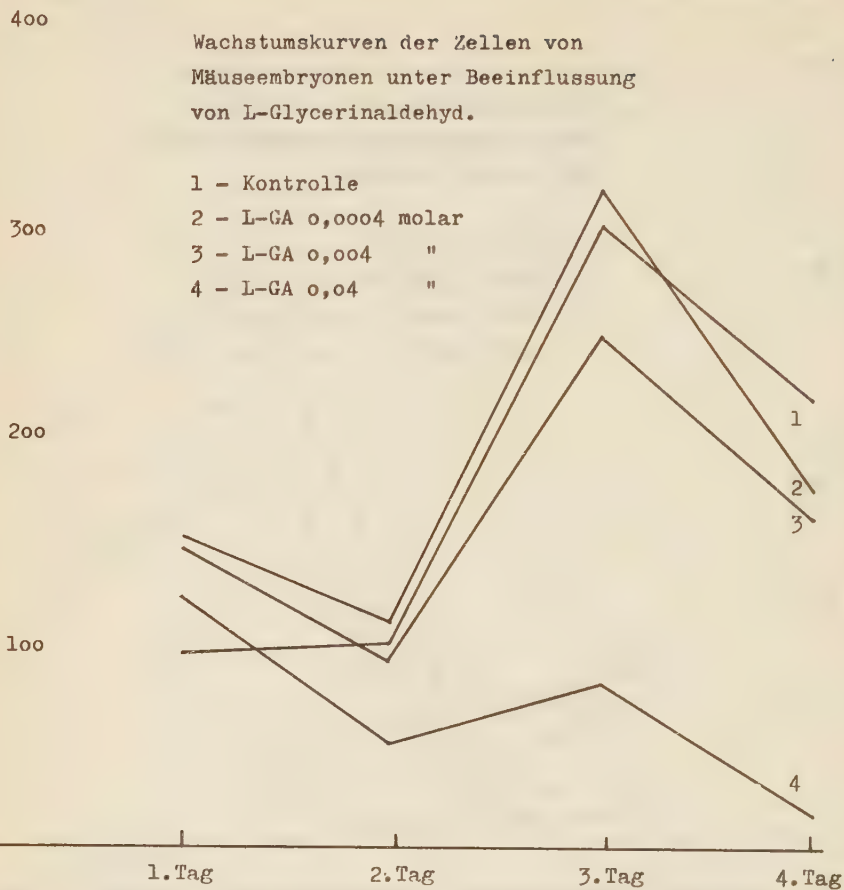
	Kontrolle	D-Glycerinaldehyd		
		0,04M/l	0,004M/l	0,0004M/l
1. Tag	92,6 3,71	112,8 5,87	122,0 5,22	115,8 6,26
2. Tag	95,9 4,17	31,8 2,90	66,8 3,16	66,4 4,61
3. Tag	295,2 6,98	20,3 2,12	193,4 7,17	237,1 8,96
4. Tag	212,2 9,41	14,2 1,16	144,8 4,94	171,3 3,50

Werte zu den kurven
(Zellen/Zählfeld).

Zellen/Zählfeld

Wachstumskurven der Zellen von
Mäuseembryonen unter Beeinflussung
von L-Glycerinaldehyd.

- 1 - Kontrolle
- 2 - L-GA 0,0004 molar
- 3 - L-GA 0,004 "
- 4 - L-GA 0,04 "



	Kontrolle	L-Glycerinaldehyd		
		0,04M/l	0,004M/l	0,0004M/l
1.Tag	92,6 3,17	119,6 8,05	141,3 5,98	147,6 8,60
2.Tag	95,9 4,17	48,0 4,67	87,3 4,91	105,4 4,64
3.Tag	295,2 6,98	78,2 4,69	244,1 4,41	311,2 7,74
4.Tag	212,2 9,41	15,5 1,46	151,0 3,66	167,4 4,85

Werte zu den Kurven
(Zellen/Zählfeld).

Zellen/Zählfeld

700

Wachstumskurven von permanenten,
embryonalen Zellen aus NMRI-Mäusen
unter Beeinflussung von
D-Glycerinaldehyd.

1

600

1 - Kontrolle

2 - D-GA 0,0004 molar

3 - D-GA 0,004 "

4 - D-GA 0,04 "

500

400

300

2

1

3

4

Tage

	Kontrolle	D-Glycerinaldehyd		
		0,04M/l	0,004M/l	0,0004M/l
1. Tag	439,9 10,72	302,6 8,12	326,7 15,19	333,5 10,31
2. Tag	523,5 6,94	366,5 13,35	500,8 20,02	547,8 49,30
3. Tag	644,3 11,59	286,7 11,89	392,0 9,37	712,0 15,18
4. Tag	709,7 11,58	177,3 11,03	606,4 11,78	761,0 5,41

Zellen/Zählfeld

700

Wachstumskurven von permanenten,
embryonalen Zellen aus NMRI-Mäusen
unter Beeinflussung von
L-Glycerinaldehyd.

1 - kontrolle

2 - L-GA 0,0004 molar

3 - L-GA 0,004 "

4 - L-GA 0,04 "

600

500

400

300

	Kontrolle	L-Glycerinaldehyd		
		0,04M/l	0,004M/l	0,0004M/l
1.Tag	439,9 10,72	385,2 10,52	316,7 11,78	315,3 5,41
2.Tag	523,5 66,94	258,4 11,61	429,4 12,30	521,1 8,02
3.Tag	644,3 11,59	161,6 7,34	444,4 11,01	644,6 27,20
4.Tag	709,7 11,58	121,6 6,69	451,6 11,12	636,0 11,51

Tage

raumes um das 2,35fache der Kontrolle. Nach Schädigung der EA-Zellen durch das L-Isomere wurde eine Vergrößerung des Rohrzuckerverteilungsraumes auf 0,064 ccm gemessen, d. h. eine Zunahme um das 3,2ofache der Kontrolle.

4.5.o. Verdopplungszeiten.

Tabellarisch gefaßte Verdopplungszeiten. Die Werte wurden aus den angegebenen Wachstumskurven graphisch ermittelt.

Molarität	Verdopplungszeit in Stunden		
	D-GA	L-GA	Kontr.
0			20,4
0,0004	15,0	21,5	
0,004	36,0	ca 7 Tage	
0,04	∞	∞	

Tab. 8: Permanente, embryonale Zellen.

Molarität	Verdopplungszeit in Stunden		
	D-GA	L-GA	Kontr.
0			12,1
0,0004	14,0	12,4	
0,004	18,6	16,2	
0,04	∞	∞	

Tab. 9: Embryonale Zellen.

Molarität	Verdopplungszeit in Stunden		
	D-GA	L-GA	Kontr.
0			12,5
0,004	14,5	36,5	
0,04	81,0	∞	

Tab. 10: Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.

4.6.o. Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Zellmembran von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.

Bei Prüfung der elektronenmikroskopisch gewonnenen Bilder zeigte sich kein morphologisch faßbares Korrelat zu den funktionellen Defekten der durch die GA-Isomeren geschädigten Zellmembran von EA-Tumorzellen. (Als Nebebefund war eine Vermehrung der Lysosomen in den geschädigten Zellen auffällig). Angesichts der Resultate dieser Untersuchungen schien es mir nicht sinnvoll elektronenmikroskopische Bilder in diese Arbeit mit aufzunehmen.

5.0.0. Diskussion

Die beiden Isomeren des GA zeigen deutliche Unterschiede in der Intensität ihrer Wirkung auf die meisten untersuchten energieliefernden und synthetisierenden Stoffwechselprozesse von somatischen Zellen und Bakterien (9, 10, 11, 12, 13). Die Stärke der Beeinflussung ändert sich in Abhängigkeit von der Stoffwechselsituation, d. h. von der An- oder Abwesenheit des Sauerstoffs in der Gasphase (9, 11, 13). Die Energiegewinnung der Zelle ist unter anaeroben Verhältnissen durch die Glykolyse als einziger Energiequelle limitiert. Bei Aerobiose ist die Atmung, verbunden mit der oxydativen Phosphorylierung, der Hauptenergielieferant. Da das L-Isomere mit Dihydroxiacetonphosphat zu Sorbose-1-Phosphat kondensiert (7) und das entstehende Substrat von Lardy et al. (8) als Inhibitor der Hexokinase erkannt wurde, ist für diese Stereoisomere die Glykolysehemmung als Inhibitionsmechanismus wahrscheinlich. Der physiologische D-GA zeigt diese Wirkung verständlicherweise nicht, sodaß sich hierdurch bedingt schon charakterisierende Unterschiede messen lassen.

Die Versuchsergebnisse in der vorgelegten Arbeit zeigen überwiegend deutliche Unterschiede in der inhibitorischen und zellschädigenden Wirkung der GA-Isomeren. Die Ergebnisse früherer Untersuchungen, die dem L-Isomeren eine stärkere Wirkung auf die Stoffwechselvorgänge zuschrieben, konnten bestätigt werden.

Die Untersuchungen über die Hemmung des ³²P-Einbaus in die Phosphatide Lecithin, Kephalin und die Gesamtfraktion zeigen, daß das L-Isomere sowohl unter aeroben wie unter anaeroben Versuchsbedingungen stärker inhibierend wirkt als der D-GA. Erstaunlich ist, daß für den L-GA unter O₂-Zufuhr eine höhere Einbauhemmung (82,2 %) gemessen wurde als unter Sauerstoffausschluß (66,6 %), während der D-GA umgekehrt unter anaeroben Bedingungen stärker inhibiert (21,0%)

als bei Aerobiose (6,4 %).

In den vorgelegten Untersuchungen ging ich von der Voraussetzung aus, daß der

³²P-Einbau ein Maß für die Phosphatidsynthese ist. Dieses Vorgehen scheint mir gerechtfertigt, weil die unter Einfluß der GA-Isomeren gemessenen Werte auf die Kontrollen bezogen wurden und da die inhibitorischen Effekte bestimmt und nicht die Absolutwerte der Phosphatidsynthesehemmung gemessen werden sollten. Die Signifikanz der erhaltenen Werte wurde durch Doppel- z. T. auch durch Dreifachbestimmungen gegeben. Bei der Bewertung der vorgelegten Meßergebnisse muß jedoch berücksichtigt werden, daß die Aktivität der Oberphase um den Faktor 10 größer war als die Aktivität/ccm der Unterphase, sodaß schon kleine Mengen mitgeschleppter Oberphase die Meßwerte beeinflussen könnten.

Die Ergebnisse der Phosphatidsynthesehemmung durch das D-Isomere stehen sowohl in aerober wie in anaerober Stoffwechselsituation in Analogie zu den von einigen Autoren gemessenen Werten der Glykolysehemmung. So gab Mendel, Strelitz und Mundell (2) eine Hemmung von 18 % (GA 3×10^{-3} molar), Oelkers (13) eine 10 %ige und Guidotti (11) eine 17 %ige Inhibition der anaeroben Glykolyse durch 10^{-2} molaren D-GA an. Warburg und Mitarbeiter (9) fanden keinen hemmenden Effekt des D-GA auf die anaerobe Glykolyse.

Die anaerobe Glykolyse wird durch den L-GA fast vollständig unterdrückt (9, 11, 13). Da für die Phosphatidsynthese große Mengen energiereicher Phosphate benötigt werden (31), könnte die Senkung der ³²P-Einbauraten über eine Produktionsverminderung dieser Phosphate durch Blockierung der Glykolyse als einziger Energiequelle erklärt werden. In einer Arbeit von Langen, Bielka und Stahl (12) wird angegeben, daß der Gehalt an energiereichem, leicht hydrolysierbarem Phosphat in untersuchten EA-Tumorzellen durch die Anwesenheit von D-GA nicht verringert wurde. Da das von den Autoren verwandte D-Isomere die Glykolyse nur

wenig hemmt und andererseits die Zusammensetzung des Gasmisches, das zur Inkubation verwandt wurde nicht vermerkt war, spricht dieser Befund nicht gegen den oben beschriebenen Hemmechanismus. Dieselben Autoren geben in der gleichen Arbeit an, daß der D-GA den ³²P-Einbau in die Phosphatide nicht hemmt. Dieses Ergebnis bestätigt die von mir gefundenen Werte über eine sehr schwache Inhibition durch den D-GA unter aeroben Versuchsbedingungen.

Da der hemmende Effekt des L-GA auf den Einbau von ³²P in die Phosphatide in Aerobiose stärker ist als in Anaerobiose, reicht die Glykolysehemmung als Erklärung dieser Wirkung nicht aus. Auch deshalb nicht, weil die Hemmung der aeroben Glykolyse erst nach 45 min voll ausgebildet ist (9) und die von mir durchgeführten Versuche diese Zeit nicht überschritten. Es liegt daher nahe, andere bzw. zusätzliche Hemmechanismen anzunehmen, um die verstärkte inhibitorische Wirkung des L-GA unter O₂-Zufuhr zu erklären.

Wu und Racker (32) fanden, daß der Eintritt von anorganischem Phosphat in die Zelle abhängig ist von den phosphorylierenden Reaktionen. Die Autoren berichteten, daß die oxydative Phosphorylierung und die Glykolyse sich in der Wirkung auf den ³²P-Eintritt addieren. Daraus ergibt sich, daß unter O₂-Zufuhr der Anteil des anorganischen Phosphates, der aus dem Medium in die Zelle eintritt, größer wird, da unter diesen Bedingungen neben der Glykolyse ein zusätzlicher Phosphat-verbrauchender Prozeß, die oxydative Phosphorylierung abläuft. Dieser Befund würde zwar den in Aerobiose gefundenen gegenüber dem in Anaerobiose erhöhten Anteil der ³²P-Aktivität intrazellulär erklären, ergibt aber keine Begründung für die aerob zu messende verstärkte Inhibition des L-Isomeren auf die Phosphatidsynthese. Schon in den ersten Arbeiten über die GA-Wirkung auf den Zellstoffwechsel wurde festgestellt, daß die Isomeren die Zellatmung nicht hemmen und es gibt auch keinen Anhalt für die Annahme,

daß diese Substanzen die oxydative Phosphorylierung entkoppeln, so daß dieser Prozeß an der gegenüber der Kontrolle erhöhten ³²P-Einbauhemmung keinen Anteil haben kann. Aus den Arbeiten von Green und Fleischer (33) ergibt sich zwar eine Beziehung der Phosphatide zur oxydativen Phosphorylierung, aber, da nach den erhobenen Befunden diese Phosphatide in erster Linie für die Struktur und den Zusammenhalt dieser Enzymketten verantwortlich sind, ist anzunehmen, daß sie metabolisch weitgehend inaktiv sind und deshalb eine Störung dieses energiegewinnenden Systems durch eine Phosphatidsynthesehemmung kaum wahrscheinlich ist.

In Übereinstimmung mit den Angaben von Wu und Racker (32) zeigte sich in den vorliegenden Versuchen unter aeroben Bedingungen ein stärkerer Übertritt von anorganischem Phosphat aus dem umgebenden Medium in die Zelle als unter anaeroben Versuchsverhältnissen. Die Autoren haben eine Aktivität von 10 000 Ipm intrazellulär bei funktionierender Glykolyse und Atmungskettenphosphorylierung gemessen. Nach Ausschaltung der oxydativen Phosphorylierung mit Dinitrophenol sank die intrazellulär zu messende Aktivität um 3700 Ipm, was einer Verminderung von 37 % entspricht. In den von mir durchgeführten Versuchen verminderte sich die Aktivität nach Ausschaltung der O_2 -Zufuhr um 63 %. Da sich die Versuchsanordnungen unterschieden, sind die Werte nur bedingt miteinander zu vergleichen. Weiter ergab sich aus der Bestimmung des in die Phosphatide eingebauten radioaktiven Phosphats (in % der eingesetzten Gesamtaktivität), daß entsprechend dem verminderten Eintritt von Orthophosphat in die Zelle in Anaerobiose die ³²P-Einbaurate sowohl der Kontrollen als auch der mit den Isomeren des GA beeinflussten Proben erheblich verringert ist. Setzt man die Phosphatidaktivität in Beziehung zur gesamten intrazellulären Aktivität, so zeigte sich, daß bei O_2 -Zufuhr das L-Isomere - kaum signifikant auch das D-Isomere - den Anteil der

Phosphatidaktivität an der gesamten, intrazellulären Aktivität senkt. Dieser Effekt ist unter O_2 -Ausschluß nicht zu registrieren. Es scheint im Gegenteil unter diesen Bedingungen die Hemmung des ³²P-Einbaus weniger stark ausgeprägt zu sein als die Hemmung anderer Stoffwechselschritte. Auch diese Ergebnisse weisen auf einen zusätzlichen, von der O_2 -Zufuhr abhängigen Mechanismus der Phosphatidsynthesehemmung durch das L-Isomere hin.

Die Untersuchung der Wirksamkeit der GA-Isomeren auf den ³²P-Einbau in Kephalin und Lecithin zeigt, daß beide Isomeren die Kephalinsynthese stärker unterdrücken als die Bildung des Lecithins. Während in der Kephalinfraktion nach Inkubation mit D-GA nur wenig der in der Kontrolle gefundenen Aktivität aerob und 0 % anaerob nachzuweisen ist, fand ich in der Lecithinfraktion aerob ca. die Hälfte und anaerob ein Viertel der in der Kontrolle gefundenen Lecithinaktivität. Das L-Isomere zeigte eine andere Verteilung seiner Wirksamkeit. Zwar hemmt es ebenfalls den ³²P-Einbau in die Kephaline unter aeroben und anaeroben Versuchsbedingungen gleichermaßen vollständig, aber in Anwesenheit von O_2 ist nur sehr wenig der in der Kontrolle bestimmten Aktivität in der Lecithinfraktion nachweisbar, während unter anaeroben Bedingungen ein etwas höherer Wert zu messen ist. Genaue Werte über den Einbau bzw. die Einbauhemmung von ³²P in die Phosphatide Lecithin und Kephalin konnten aufgrund methodischer Schwierigkeiten nicht angegeben werden (siehe 4.3.0.).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß ein Angriffspunkt des D-GA die Verhinderung der Veresterung des D- α,β -Diglycerid mit dem Phosphoryläthanolamin ist, da die Lecithinsynthese über eine Methylierung des Kephalin dann zwar blockiert ist, nicht aber der Hauptsyntheseweg auf dem CDP-Cholin den Phosphocholinrest auf ein Diglycerid überträgt. Diese Wirkung könnte einmal dadurch bewirkt werden, daß das reaktionsvermittelnde Enzym Äthanolaminphos-

phototransferase in seiner Aktivität beeinflusst wird, zum anderen aber auch durch eine mangelhafte Bereitstellung des phosphorylierten Colamins. Da unter aeroben Inkubationsverhältnissen die energetische Situation der untersuchten EA-Tumorzellen nicht oder nur sehr wenig durch den D-GA beeinflusst wird, scheint ein Mangel an ATP nicht die Ursache der Hemmung des ³²P-Einbaus in das Kephalin zu sein. In Anaerobiose verringert sich nach Inkubation mit D-GA auch der Einbau des radioaktiven Orthophosphates in Lecithin. Dieser gegenüber der Kontrolle erheblich eingeschränkte ³²P-Einbau kann kaum durch die nur geringe Wirkung des D-GA auf die anaerobe Glykolyse bedingt sein, sondern scheint ebenso, wie die totale Blockierung des ³²P-Einbaus in das Kephalin ein eigenständiges Phänomen zu sein. Inwieweit diese Befunde in Beziehung stehen zu der von Oelkers, Schmialek und Wenzel (13) an EA-Tumorzellen gemessenen Hemmung des Thymidineinbaus in DNS von 80 - 90 % durch den D-GA, ist zur Zeit noch nicht zu sagen. Nach der Bestimmung des Einbaus von ³²P

in die Gesamthosphatidfraktion zeigte das L-Isomere aerob die stärkste inhibitorische Wirkung. Es war deshalb nicht überraschen, nach Messung der isolierten Lecithinaktivität diesem Effekt erneut zu begegnen. Diesen Befund zu diskutieren, wurde schon oben versucht.

Da Lecithin und Kephalin die Hauptkomponenten der Lipoidphase von Zellmembranen sind, schien es mir wichtig, mögliche funktionelle und morphologische Veränderungen an den mit den Isomeren des GA behandelten Zellmembranen zu untersuchen. Da die Saccharose ungeschädigte Zellmembranen nicht oder nur sehr langsam durchdringen kann (25, 26), erschien sie ideal geeignet zur Prüfung der Membranpermeabilitätsveränderung. Es zeigte sich, daß nach einer zehnminütigen Inkubation der durch die GA-Isomeren vorgeschädigten Zellen in isotoner Saccharose-Lösung die Rohrzuckermenge, die in einem cmm Zell-

sediment gemessen wurde, nach Schädigung durch das D-Isomere um das 2,35fache und nach Schädigung durch das L-Isomere um das 3,2fache der Kontrolle zunahm. Da in den Zellmembranen somatischer Zellen noch kein Enzymsystem gefunden wurde, das den Rohrzuckertransport vermittelt, kann die GA-Wirkung nicht durch die Hemmung eines solchen Systems erklärt werden, sondern es muß angenommen werden, daß die Membran generalisiert geschädigt wurde. Dies könnte durch eine Blockierung oder Aktivierung von Enzymen bedingt sein. Da eine stereospezifische Inhibition von Enzymen bekannt ist (34, 35), ließe sich auch die unterschiedliche Wirkung der GA-Isomeren erklären. In einer Arbeit von Rothfield und Mitarbeitern (36), in der die Bedeutung der Phospholipide für die Entwicklung der Bakterienzellwand beschrieben wurde, wird festgestellt, daß die Phosphatide wahrscheinlich maßgebend an enzymatischen Reaktionen beteiligt sind, die zum Aufbau makromolekularer Komponenten der Zellwand führen, und es wurde die Vermutung geäußert, daß das Kephalin bei diesen Vorgängen eine besondere Rolle spielt. Da die Phosphatide Lecithin und Kephalin einen beträchtlichen "turnover" des Phosphatanteils zeigen (37) und die GA-Isomeren besonders den ³²P-Einbau in das Kephalin inhibieren, ist selbst unter der Einschränkung, daß es sich in dem einen Fall um Bakterien und im anderen Fall um somatische Zellen handelt, eine Beeinflussung auf diesem Wege in die Überlegung mit einzubeziehen. Sollte es sich um eine stereospezifische Wirkung der GA-Isomeren auf ein Enzym oder ein Enzymsystem handeln, müßte allerdings gefordert werden, daß nur ein Isomeres wirksam wird, und da dies nicht der Fall ist, müssen zusätzliche oder andere Hemmechanismen gegeben sein.

Vielleicht ist auch eine physiko-chemische Wirkung des GA die Ursache der Permeabilitätsveränderung der Zellmembran. Da die biologischen Membranen wahrscheinlich in hohem Maße kooperative Strukturen darstellen (38), könnte die

Störung der Beziehung von Membrankomponenten an einer Stelle zu einem Zusammenbruch des gesamten Systems führen. Erscheinungen dieser Art, als Alles-oder-Nichts-Reaktion, zeigt die Nervenzelle bei Aufnahme und Weiterleitung von Impulsen oder Bakterienmembranen nach Kontakt mit einem einzigen Molekül Colicin (39). Für einen Reaktionsmechanismus dieser Art spricht auch das Fehlen einer elektronenmikroskopisch nachweisbaren Membranveränderung. Trotz des deutlichen, funktionellen Defektes (Permeabilitätsveränderung) zeigte sich kein morphologisch sichtbares Korrelat. Über sehr ähnliche Befunde berichten auch Green et al. (40).

In zahlreichen in-vitro-Versuchen (41, 42, 43) wurde das D-Isomere und das Racemat in ihrer cytotoxischen Wirksamkeit auf neoplastische und nicht maligne Zellstämme geprüft. Ich fand jedoch keinen Literaturhinweis auf die Untersuchung des zellabtötenden oder zellhemmenden Effektes beider Isomere auf Krebszellen und nicht maligne, normale Zellen. Deshalb und um zu prüfen, inwieweit die unterschiedliche Stoffwechselsituation der Krebs- und der Normalzelle den cytotoxischen Effekt der GA-Isomeren beeinflusst, wurde die Vermehrung dieser beiden Zelltypen nach Inkubation mit D- und L-GA untersucht.

Es zeigte sich, daß das L-Isomere auf die Vermehrung maligner Zellen einen stärkeren cytotoxischen Effekt hat als der D-GA, während die Wirkung der GA-Isomeren auf normale Zellen keine signifikanten Unterschiede aufweist. Der D-GA zeigte in einer Konzentration von 4×10^{-4} M/l keine inhibitorische Wirkung mehr auf die Zellvermehrung, während sie für das L-Isomere noch nachzuweisen war. Ob die Stimulierung der Vermehrung durch den D-CA in dieser niedrigen Konzentration, die für die embryonalen und maligne gewordenen embryonalen Zellen registriert wurde, durch den Aldehyd bedingt war, ist schwer zu entscheiden. Allerdings hat Lewerenz (42) an Hela-Zellen unter ähnlichen Versuchs-

⁻⁴
 bedingungen und nach Vorinkubation mit 10^{-3} molarem D, L-GA den gleichen Effekt
 beobachtet. In allen Versuchen zeigte sich, daß die GA-Isomeren in 4×10^{-3} mo-
 larer Endkonzentration die stärksten Unterschiede in ihrer wachstumhemmenden
 Wirksamkeit auf Krebszellen zeigen. Sehr deutlich wird dies in dem Versuch
 an permanenten, embryonalen Zellen. So wurde nach Vorinkubation mit 4×10^{-3} mo-
 larem D-GA eine Verdopplungszeit von 36,0 Stunden und nach Vorinkubation mit
 dem L-Isomeren in gleicher Konzentration eine Verdopplungszeit von ca 7 Tagen
 gemessen. In einer Konzentration von 4×10^{-2} Mol/l zeigen beide Isomeren auf
 alle untersuchten Zellkulturen einen irreversiblen cytotoxischen Effekt.
 Diese Ergebnisse stehen im scheinbarem Widerspruch zu den von Warburg und Mit-
 arbeitern (9) mitgeteilten Befunden, nach denen die Isomere des GA die gleiche
 Cytotoxizität zeigen, das D-Isomere in der Wirkung sogar überwiege. Da diese
 Versuche in vivo angestellt wurden, ist es kaum möglich, die zellabtötende Kon-
 zentration am Ort der Wirkung zu bestimmen, da zahlreiche physiologische Para-
 meter nicht zu erfassen sind. Es ist deshalb möglich, daß der D-GA in Konzen-
 trationen vorlag, in denen er auch in den von mir angestellten Versuchen zell-
 abtötend wirksam wird und gegenüber dem L-Isomeren keine Unterschiede mehr auf-
 weist. Die Unterschiedlichkeit der GA-Isomeren in ihrer Cytotoxizität zeigte sich
 in der Quantifizierung bzw. in der Untersuchung der Beziehung zwischen Wir-
 kung und wirksamer GA-Konzentrationen. Auch andere Untersucher fanden eine ver-
 gleichsweise schwache Wirkung des D-GA auf maligne Zellen und kaum Unterschiede
 in seiner cytotoxischen Wirksamkeit auf die Kulturen normaler und maligner Zel-
 len (42, 43). Auch diese Autoren zeigten, daß nur in hohen Dosen ein zellab-
 tötender Effekt durch diese Isomere zu erzielen ist.
 Es stellt sich die Frage nach der Ursache dieser cytotoxischen Wirksamkeit des
 GA. Da glykolytisch aktive Zellen wie die Krebszellen stärker als normale Zel-

len und andererseits durch den L-GA stärker als durch das D-Isomere in ihrer Vermehrung gehemmt werden, scheint die Glykolyseinhibition eine Ursache dieser Erscheinung zu sein. Wetzell und Schneider (44) konnten zeigen, daß Formaldehyd EA-Zellen in einer Konzentration abtötet, bei denen innerhalb der Versuchsdauer noch keine Hemmung der Atmung oder Gärung festzustellen ist. Diese Autoren nahmen an, daß eine Einwirkung des Aldehyds auf einsträngige Nukleinsäuren für diese Geschehen ursächlich ist. Die schon zitierten Langen, Bielka und Stahl kamen auf Grund der von ihnen angestellten Untersuchungen mit dem D, L-GA zu derselben Annahme. Über diesen Mechanismus ließ sich die von anderen Autoren (10, 11, 45) als Ursache der Cytotoxizität gewertete Proteinsynthesehemmung als sekundäres Geschehen auffassen. Bazill (14) vermutet, daß zwischen Zellmembransynthese und der DNS-Synthese von Bakterien eine enge Korrelation besteht und daß eine Hemmung der DNS-Synthese über einen mangelhaften Aufbau der Zellwand zur Unterdrückung der Zellteilung führt. Da die Replikation der DNS über Einstrangzustände verläuft, könnte eine Hemmung der Zellvermehrung auch über diesen Weg möglich sein. Erstaunlich ist in diesem Zusammenhang der schon zitierte Befund von Oelkers, Schmialek und Wenzel, die fanden, daß das D-Isomere unter den Bedingungen der Anaerobiose und der Aerobiose den Thymidineinbau in die DNS um 80 - 90 % der Kontrolle hemmt. Da der Unterschied in der Wirksamkeit der beiden Isomere auf die Vermehrung der malignen Zelle jedoch deutlich signifikant ist, scheint die Hemmung der DNS-Replikation nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wurden weitere Untersuchungen zur Differenzierung der unterschiedlichen Wirkung von D- und L-GA beschrieben und die Ergebnisse diskutiert. Die Untersuchungen wurden vor allem an EA-Tumorzellen vorgenommen.

Es zeigte sich, daß das L-Isomere den ³²P-Einbau in Phosphatide stärker hemmt als das D-Isomere. Die Inhibition des L-GA war in Anwesenheit von O₂ stärker als in Anaerobise. Beide Isomeren hemmen den Einbau radioaktiven Orthophosphats in Kephalin stärker als den Einbau in Lecithin. Der Anteil des intrazellulär nachgewiesenen ³²P war unter aeroben Verhältnissen größer als unter anaeroben Versuchsbedingungen.

Da die Phosphatide am Aufbau der biologischen Membranen beteiligt sind, wurden Membranveränderungen am Permeabilitätsverhalten des Rohrzuckers geprüft. Es ergab sich, daß das L-Isomere die Membran stärker schädigt als der D-GA. Elektronenmikroskopisch wurde kein morphologisches Korrelat zu den funktionellen Defekten gefunden.

In weiteren Versuchen wurde die Einwirkung beider Isomeren des GA auf die Vermehrung maligner Zellen in vitro untersucht. Auch hier zeigte sich der L-GA stärker wirksam als der D-GA. Die Differenz in der cytotoxischen Wirksamkeit der beiden Glycerinaldehyde war bei einer Endkonzentration von 0,004 M/l am größten. Diese Versuche wurden an zwei unterschiedlichen Zellstämmen vorgenommen. Normale, embryonale Zellen wurden durch beide Isomeren in einer Konzentration von 0,004 M/l in ihrer Vermehrung kaum beeinflusst. Es zeigte sich, daß beide Stereoisomere des GA in ihrer Wirkung auf die Zellvermehrung normaler Zellen keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

7.o.o. Literaturverzeichnis

- 1 B. Mendel
Klin. Wochenschrift 8, 167 (1929)
- 2 E. Mendel, F. Strelitz, D. Mundell
Nature 141, 288 (1938)
- 3 J. Needham, H. Lehmann
Biochem. J. 31, 1210 (1937)
- 4 G. Holmes
Ann. Rev. Biochem. 3, 395 (1934)
- 5 Ch. A. Ashford, K. C. Dixon
Biochem. J. 29, 157 (1935)
- 6 G. Adler, F. Calvet, G. Günther
Z. Physiol. Chem. 249, 40 (1937)
- 7 O. Meyerhoff, K. Lohmann, Ph. Schuster
Biochem. Z. 286, 319 (1936)
- 8 H. A. Lardy, V. D. Wiebelhausen, K. M. Mann
J. Biol. Chem. 187, 325 (1950)
- 9 O. Warburg, K. Gawehn, A. Geissler, S. enz
Z. klin. Chem. 1, 175 (1963)
- 10 J. Drews, P. Wahl, E. Fölsch
Klin. Wochenschrift 42, 776 (1964)
- 11 G. G. Guidotti, A. Fonnesu, E. Ciaranfi
Cancer Res. 24, 900 (1964)
- 12 L. Langen, H. Bielka, J. Stahl
Acta biol. med. german. 19, 17 (1967)

- 13 W. Oelkers, M. Wenzel, P. Schmialek
Z. Naturforschung 20, 227 (1965)
- 14 G. W. Bazill
Nature 216, 346 (1967)
- 15 A. S. Perlin, C. Brice
Canad. J. Chem. 34, 85 (1956)
- 16 R. Willstätter, G. Schudel
Chem. Ber. 51, 780 (1918)
- 17 W. E. Trevelyan, D. P. Procter, J. S. Harrison
Nature 166, 444 (1950)
- 18 W. W. Umbreit, R. H. Burris, J. F. Stauffer
Manometrics Techniques, Burgess Publishing Co. Minneapolis, USA
- 19 J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane
J. Biol. Chem. 266, 497 (1957)
- 20 Chromatographie
E. Merck A. G., Darmstadt
- 21 E. Graf, Y. Stein
Biochim. Biophys. Acta 116, 166 (1966)
- 22 W. Wober, O. W. Thiele
Biochim. Biophys. Acta 116, 163 (1966)
- 23 Biochemical Preparations Vol. 6
John Wiley u. Söhne, New York
- 24 Biochemical Preparations Vol. 2
John Wiley u. Söhne, New York
- 25 N. Deane, G. E. Schreiner, J. S. Robertson
J. Clin. Investigations 12, 1463 (1951)

- 26 Th. Günther, Cl. Goecke
Z. Naturforschung 21 b, 1171 (1966)
- 27 B. E. Wahler
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie 306, 84 (1956)
- 28 H. Eagle
J. Biol. Chem. 214, 839 (1955)
- 29 Th. Günther
Habilitationsschrift Freie Universität Berlin (1966)
- 30 Th. Günther
Habilitationsschrift Freie Universität Berlin
- 31 E. P. Kennedy
Federation Proceedings 20, 934 (1961)
- 32 R. Wu, E. Racker
J. Biol. Chem. 234, 1033 (1959)
- 33 D. E. Green, S. Fleischer
Biochim. Biophys. Acta 70, 554 (1963)
- 34 G. Hasenbank, F. Körber, P. Siegmund
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 349, 310 (1968)
- 35 S. Englard, H. H. Breiger
Biochim. Biophys. Acta 56, 571 (1962)
- 36 L. Rothfield, M. Takeshita, M. Perlman, R. W. Horne
Federation Proceedings 25, 1495 (1966)
- 37 E. V. Marinetti, R. F. Witter, E. Stotz
J. Biol. Chem. 226, 475 (1957)
- 38 J. P. Changeux, J. Thiery, Y. Tung, C. Kittel
Proceedings N. S. A. 57, 335 (1967)

- 39 M. Nomura
Proc. Nat. Ac. Science 52, 1514 (1964)
- 40 H. Green, R. A. Fleischer, P. Barrow, B. Goldberg
J. Exp. Med. 109, 511 (1959)
- 41 T. Schramm
Acta biol. med. german. 15, 343 (1965)
- 42 H.-J. Lewerenz
Z. Krebsforschung 69, 260 (1967)
- 43 N. Brock, T. Nienkamp
Z. Krebsforschung 67, 93 (1965)
- 44 G. Wetzel, F. Schneider, A. M. Fretzdorf, K. Seynsche, H. Finger
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 334, 1 (1963)
- 45 J. Drews, E. Fölsch
Naturwissenschaften 51, 440 (1964)

Herrn Professor Dr. Kümmel, I. Zoologisches Institut der Freien Universität Berlin, danke ich für die Hilfe und Beratung bei der Herstellung und Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Lebenslauf

Am 8. 12. 1937 wurde ich als Sohn des Architekten Dipl. Ing. Kurt Georg Simon und seiner Frau Gertrudis Barbara, geb. Tüllmann, in Mühlheim geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Bad Wildungen, Schwarzenfels, Wesel und Blumenkamp wurde ich 1950 am Staatl. Gymnasium Wesel aufgenommen und besuchte diese Schule bis zur Versetzung in die Oberprima. Das Abitur habe ich 1960 vor einer Kommission des Deutschen Gymnasiums Freising im Jugenddorf Christophorusschule Berchtesgaden abgelegt.

Nach einer halbjährigen Tätigkeit als Praktikant im Baugewerbe studierte ich drei Semester Architektur an der Technischen Universität Berlin. Danach wechselte ich das Studium und bestand im März 1968 das medizinische Staatsexamen an der Freien Universität Berlin.

Seit April 1968 bin ich am Institut für Physiologische Chemie der Freien Universität Berlin als Medizinalassistent tätig.

